

بسمه تعالی

موسسه تحقیقات شیلات ایران

معاونت تحقیقاتی

بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان

گزارش تخصصی

“ وقوع اولین مورد بیماری نکروز عصبی ویروسی

(VER / VNN)

Viral encephalopathy and retinopathy (VER)

or

Viral nervous necrosis (VNN)

در ماهیان کفال طلایی (Golden grey mullet)

دریای مازندران “



تهیه و تنظیم از:

دکتر سید جلیل ذریه زهرا

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات شیلات ایران

فروردین ۱۳۸۳

“ هر گونه استفاده از منابع علمی و تصاویر این گزارش با ذکر مآخذ آن آزاد است ”

## گزارش وقوع اولین مورد بیماری نکروز عصبی ویروسی

(VER/VNN)

### Viral encephalopathy and retinopathy (VER) or Viral nervous necrosis (VNN)

#### در ماهیان کفال طلائی (Golden grey mullet)

#### دریای مازندران

مقدمه:

کفال ماهیان از ماهیان دریایی هستند که در آبهای مناطق معتدل و گرمسیر انتشار دارند و فقط سه جنس از آنها در آبهای شیرین زندگی می کنند. غذای این ماهیان در سنین مختلف و مراحل رشد بدین صورت است که بچه ماهیان کفال از پلانکتونها، بچه ماهیان یکساله از پلانکتونها و جانوران کفزی و در بقیه مراحل زندگی از بقایای گیاهان و جانوران<sup>1</sup> تغذیه کرده و اصطلاحاً دتریت خوار می باشند که در این مرحله با دیگر ماهیان استخوانی در رقابت نیستند. در دریای خزر دو گونه کفال *Liza-saliens* و *Liza-auratus* زندگی می کنند که بیشترین جمعیت کفال ماهیان را گونه دوم *Liza-auratus* تشکیل می دهند.

این ماهیان تقریباً نیمی از ذخائر ماهیان استخوانی را در دریای خزر به خود اختصاص می دهند و مراحل مختلف تولید مثل و تکثیر آنها در شرایط دریا انجام می شود و مهمتر این که با تغذیه از بقایای جانوری و گیاهی (دتریت ها) در پالایش بستر از تجمع مواد آلی حاصل از تجزیه آنها و حفظ تعادل اکوسیستم آبی، نقش مهمی را ایفا می نمایند. با توجه به نوع غذای مصرفی و اینکه همراه این دسته از مواد غذایی، بقایای آلاینده ها (سموم نباتی، هیدروکربورهای نفتی، فلزات سنگین) و پروتئین های سمی ممکن است مورد استفاده قرار گیرند لذا بیشتر در معرض این نوع آلودگی ها و تضعیف سیستم ایمنی قرار دارند. ضمن آنکه عوامل بیماریزای زنده (میکروارگانیزم ها و انگل ها) نیز ممکن است بصورت اختصاصی کفال ماهیان را به عنوان میزبان انتخاب نمایند. معمولاً بیماری های ماهیان وحشی به دلیل شرایط زندگی آنها، عدم دسترسی و در نهایت عدم امکان کنترل و درمان، کمتر مورد توجه قرار می گیرد. متأسفانه در طول سالهای اخیر علائم غیرمعارف در کفال ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر در دو مقطع زمانی متفاوت (سال ۸۲ و ۸۰) مشاهده گردیده است که قطعاً در صورت استمرار، ضمن وارد نمودن خسارات اقتصادی به ذخایر ماهیان دریای خزر و مشکلات زیست محیطی، ممکن است مشکلاتی را از منظر بهداشت عمومی و مصرف انسانی به دنبال داشته باشد:

۱) در سال ۱۳۸۰ حفاظت منابع استان مازندران و معاونت صید و صیادی گزارش نمودند که در سواحل مازندران (بابلسر) کفال ماهیان تلف شده و یا در حال تلف شدن مشاهده می گردند که متعاقب آن همکاران پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به منطقه عزیمت نموده و

<sup>1</sup> - Detritus

تعداد ۱۵۰ قطعه کفال اوراتوس در حال مرگ از سواحل بندر فریدونکنار که در مجاورت بابلسر قرار دارد جمع آوری گردید. ماهیان مزبور علایمی مانند: خونریزی های جلدی بصورت رگه های خونریزی، خونریزی های ریز داخل عضلانی (پشتی و اکیموز) و اتساع شکم (آسیت) را به همراه داشتند. این حالت در بررسی بعمل آمده در هیچ یک از جایگاه های صید ماهیان استخوانی مشاهده نگردید.

(۲) در تاریخ ۸۲/۱۱/۶ متعاقب گزارش مکتوب مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر (گیلان) مبنی بر مشاهده مواردی از تورم شکمی در میان ماهیان صید شده شرکت های تعاونی پره منطقه جفروود تا زیباکنار استان گیلان هماهنگی های لازم از سوی بخش بهداشت و بیماری های آبزیان موسسه در خصوص اعزام همکاران به منطقه و بازدید از تعاونی های مربوطه و انجام نمونه برداری های لازم از ماهیان مبتلا، آب دریا و بستر بر اساس دستورالعمل های مربوطه صورت گرفت. در بازدید از منطقه مشاهده گردید که ماهیان مبتلا که اغلب در دامنه وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم بوده، در اثر اتساع کیسه شنا و تجمع گاز بسیار در آن دچار تورم محوطه بطنی، بیحالی و تحرک کم شده و به پهلو و یا بصورت طاقباز (سطح شکمی ماهی رو به بالا) در آب شنا نموده و به آسانی با دست و یا توسط پرندگان صید می شدند. سطح ظاهری بدن و چشمها فاقد هر گونه ضایعات مرضی و اروزیون های خاص بوده و در کالبد گشایی علاوه بر اتساع غیر عادی کیسه شنا و تجمع گاز در آن، دژنرسانس کبد و تجمع صفرای شفاف و بیرنگ در کیسه صفرا، تجمع مقادیر غیر عادی ماسه ریز دریا در سکوم، روده ها و پیش معده، آتروفی کلیه ها و در مواردی نیز پرخونی و آثار خونریزی در روده ها مشاهده گردید (تصاویر ذیل).





نمونه های مبتلا به آزمایشگاه مرکز منتقل و پس از خونگیری جهت آزمایشات هماتولوژی و سنجش آنزیم های سرمی، مورد کالبد گشایی قرار گرفته و از اندامهای داخلی: کبد، کلیه، SGPT و SGOT آنزیم های کبدی LDH و ALP، طحال، کیسه شتا، روده و پیش معده، مغز، آبشش، پوست و عضله، کیسه صفرا و گونادها نمونه های مورد نظر جهت مطالعات آسیب شناسی تهیه و در فرمالین ۱۰٪ فیکس و به آزمایشگاه تهران منتقل گردید. همچنین در تاریخ ۸۲/۱۱/۱۱ مواردی از ماهیان مبتلا از دریا صید و بصورت زنده با کپسول اکسیژن و بصورت منجمد (در داخل فویل آلومینیومی) مجاور یخ به تهران منتقل و جهت انجام آزمایشات تکمیلی باکتریولوژی به آزمایشگاه منتقل گردید.

با عنایت به اهمیت ذخایر کفال ماهیان در دریای خزر و میزان صید آن که در سال های اخیر روند صعودی داشته است (تابلوی شماره ۱) و تجربه تلخ شانه دار مزاحم و کاهش شدید ذخایر ماهیان کیلکا و مسایل حاشیه ای اجتماعی همچون شایعه ارتباط این عارضه با وقوع احتمالی زلزله در منطقه و نگرانی های مردم و مسئولین منطقه و صحبت های شفاهی صیادان مبنی بر کاهش مزه و کیفیت طعم ماهی کفال در ذائقه مردم و نیز کاهش قیمت آن در بازار همگی ایجاب می نمود که موضوع با حساسیت ویژه از نزدیک مورد پیگیری لازم قرار گیرد تا بتوان قبل از وقوع یک بحران جدید دیگر در دریای خزر، از تبعات احتمالی آن جلوگیری نمود.

در راستای پیگیری های بعمل آمده و اخذ نتایج آزمایشات بعمل آمده مشخص گردید که نتایج آزمایشات آب شناسی و رسوبات بستر طبیعی بوده و مورد خاصی در پارامترهای فیزیکی شیمیایی آب دریا و رسوبات بستر مشاهده نگردید (جداول آزمایشات فیزیکی شیمیایی به پیوست ضمیمه می باشد)، همچنین نتایج آزمایشات باکتریولوژی و انگل شناسی و تک یاخته شناسی نیز منفی اعلام گردید.

سال	۱۳۷۰	۱۳۷۱	۱۳۷۲	۱۳۷۳	۱۳۷۴	۱۳۷۵	۱۳۷۶	۱۳۷۷	۱۳۷۸	۱۳۷۹	۱۳۸۰	۱۳۸۱	۱۳۸۲
میزان صید (ت.)	۳۹۷۰	۴۲۴۴	۴۱۴۵	۲۴۲۴	۳۵۴۶	۲۹۰۶	۲۸۵۴	۳۷۸۸	۳۶۸۴	۴۵۴۸	۵۲۶۳	۶۴۴۶	۴۰۰۰*

تابلوی شماره ۱: آمار صید سالیانه کفال ماهیان دریای خزر

\* میزان پیش بینی شده تا پایان سال ۸۲ (مآخذ: مدیریت ارزیابی ذخایر موسسه تحقیقات شیلات ایران)

با توجه به جمعیت ماهیان در معرض خطر، منطقه جغرافیایی، میزان وقوع بالای آن، نتایج بررسی های بعمل آمده، وقوع عارضه مزبور برای اولین بار در منطقه و کشور و نبود گزارش و منابع علمی داخلی در این خصوص جهت روشن شدن علت اصلی بروز این عارضه در کفال ماهیان در راستای ارتباطات علمی بین المللی با مراکز تحقیقاتی معتبر با آقای Dr. Igor Shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (VNIIPRH) از طریق ایمیل وارد مشاوره شده و علائم بالینی ماهیان مبتلا، نتایج اقدامات انجام شده به همراه تصاویری از سیمای کلینیکی بیماری، و نحوه وقوع بیماری در منطقه به آگاهی ایشان رسید (در تاریخ ۱۱ بهمن ماه ۸۲).

با توجه به بررسی های بعمل آمده بر روی منابع و اطلاعات موجود، بیماری نکروز عصبی ویروسی (VNN) به عنوان مظنون اولیه مورد توجه قرار گرفته و بر این اساس نمونه های مورد نظر بویژه از نقطه نظر آسیب شناسی و جستجوی ضایعات و اکوئوله در بافت مغز تهیه و مورد بررسی های تخصصی قرار گرفت.

در این ارتباط مقاطع آسیب شناسی از بافتهای: کبد، کلیه، مغز، طحال، آبشش، کیسه شنا، پوست و عضلات، روده و پیش معده تهیه و مورد بررسی قرار گرفته و در بافت مغز مواردی از آثار و اکوئوله شدن مشاهده گردید. در این راستا با توجه به عدم دسترسی به تیره سلولی SSN-1 جهت کشت سلولی و نیز پرایمرهای اختصاصی جهت انجام آزمایش PCR، آزمایشگاههای فرانس سازمان جهانی بیماری های واگیر دام (OIE) مورد شناسایی واقع گردید (فهرست آن ضمیمه می باشد).

علاوه بر آن با یکی از محققین برجسته تایوانی خانم Prof. Chi shau، chi مذاکره گردید نامبرده قبلاً این بیماری را در کشور تایوان برای اولین بار شناسایی نموده بود. همچنین علاوه بر ایشان، با سه مرکز فرانس این بیماری در کشورهای ایتالیا، ژاپن و کره جنوبی مکاتبه گردید و با ارائه تاریخچه بیماری، علائم بالینی و تشخیص اولیه از آنان در خواست گردید تا ضمن موافقت با ارسال نمونه های مرضی، آزمایشات تکمیلی از قبیل: کشت سلولی جهت جداسازی ویروس، آزمایشات سرمی همچون FAT، مطالعات هیستوپاتولوژی و مولکولی PCR جهت تشخیص نهایی صورت پذیرد. (تصویر مکاتبات ضمیمه می باشد).

در مورد کشور روسیه، از همان ابتدا آقای Dr. Igor اعلام نموده بودند که به علت عدم دسترسی به کفال ماهیان و نبود بیماری VNN در آن کشور هیچگونه امکانات تشخیصی چون تیره های سلولی و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص این بیماری در اختیار ندارند. خوشبختانه از ۴ آزمایشگاه مورد مکاتبه، Prof. Chi shau، chi از تایوان و Prof. Toshihiro Nakai از کشور ژاپن به این در خواست پاسخ مثبت دادند. (پاسخ ها ضمیمه می باشد)

لازم به ذکر است بعدها مشخص گردید که علت عدم پاسخ دو آزمایشگاه دیگر در ایتالیا و کره جنوبی تغییر آدرس آنان و عدم دریافت فاکس ارسالی بوده است. متعاقباً پیگیری های بعمل آمده موفق به ایجاد ارتباط رایانه ای با آقای Prof. Bovo در ایتالیا شده و خوشبختانه اطلاعات و تصاویر ارزشمندی از طریق ایشان دریافت گردید که مقالات واصله در پیگیری های بعدی بسیار موثر بوده است.

در تاریخ سوم اسفند ماه براساس دستورالعمل های دریافتی از نامبردگان که اغلب بر طبق مقررات و پروتکل های سازمان OIE تدوین شده بود، عملیات آماده سازی نمونه ها جهت ارسال به آزمایشگاههای رفرانس به شرح ذیل انجام گردید:

۱. ماهیان صید شده که قبلاً دارای علائم بالینی مورد نظر بوده و بصورت زنده سریعاً منجمد شده بودند جهت تهیه نمونه در نظر گرفته شدند.

۲. ماهیان مزبور در شرایط آسپتیک کالبد گشایی شده و از اندامهای داخلی چون: کبد، کلیه، طحال، چشم و مغز نمونه برداری شده و این نمونه ها بصورت استریل خارج شده و کبد و طحال با هم و نمونه های مغز بصورت جداگانه از پنج ماهی مبتلا استخراج و در محلول بافر<sup>۱</sup> (PBS) قرار گرفته و توسط همزن برقی بصورت هموزن در آمده و سپس به مدت ده دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) قرار گرفته، سپس جهت استریل کردن نهایی و جدا کردن باکتری های احتمالی نمونه های مغز از فیلتر ۰/۴۵nm استفاده گردید و محلول رویی حاصل از سانتریفوژ (Supernatant) از این فیلتر عبور داده و مایع حاصل را در ظروف استریل مخصوص بنام Eppendorf 2<sup>cc</sup> ریخته و پس از برچسب زدن<sup>۲</sup> در فریزر ۲۰<sup>oC</sup> - قرار داده شد.

۳. نمونه های مغز، چشم و اندامهای داخلی (کبد، کلیه، طحال) که قبلاً در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده بود، پس از خروج از فرمالین در داخل کاغذ صافی آغشته به الکل ۷۰٪ قرار گرفته و آن جهت جلوگیری از تبخیر الکل در میان فویل آلومینیوم بسته بندی شده و برچسب گذاری<sup>۳</sup> گردید. این نمونه ها جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی و FAT تهیه گردید.

۴. همچنین تعدادی مقطع آسیب شناسی شامل کبد، کلیه، طحال، کیسه صفرا، کیسه شنا، روده، مغز و چشم که آثار ضایعات خاصی از قبیل واکوئولاسیون در مغز را دارا بودند در فویل آلومینیوم بسته بندی و سپس برچسب گذاری شد.

شایان ذکر است، بر اساس دستورالعمل ارسالی از سوی آزمایشگاههای رفرانس یاد شده، در ابتدا مقرر بود نمونه های منجمد در مجاورت یخ خشک<sup>۴</sup> بسته بندی و ارسال گردد تا شرایط مناسب تری جهت حفظ و بقای پاتوژن های احتمالی فراهم گردد ولی متأسفانه علیرغم یافتن منابع تهیه یخ خشک و هماهنگی های مربوطه، شرکت پست پشیمانز مربوطه<sup>۴</sup> به دلیل مقررات داخلی خود، موافق با پذیرش و ارسال نمونه های منجمد همراه با یخ خشک نبود.

علی ایحال نظر به اهمیت موضوع و پیگیری های همکاران مرکز تحقیقات گیلان به دلیل شرایط خاص استان، علیرغم میل باطنی مبنی بر وجود شرایط غیر استاندارد در حمل نمونه ها، نسبت به ارسال نمونه های یاد شده به کشور ژاپن و تایوان در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۶ اقدام لازم صورت گرفته و مراتب طی نامه ای به اطلاع آنان رسید (تصاویر مکاتبات پیوست می باشد)

<sup>1</sup> - Phosphate buffered saline

<sup>3</sup> - Labeling

<sup>4</sup> - Dried - Ice



لازم به ذکر است کلیه نمونه های ارسالی علامت گذاری و کد بندی شد و جزئیات مربوط به نمونه های ارسالی بصورت واضح و مشخص از طریق E.mail به آگاهی پروفیسور Shau - Chi رسید. متعاقب پیگیری های بعمل آمده مشخص گردید که نمونه های ارسالی به کشور تایوان و ژاپن به ترتیب در تاریخ ۸۲/۱۲/۱۹ و ۸۲/۱۲/۲۰ به آزمایشگاههای مزبور واصل گردیده است.

خوشبختانه نمونه های مزبور جهت انجام آزمایشات مولکولی مناسب تشخیص داده شد و متعاقباً در تاریخ ۸۲/۱۲/۲۷ اولین پاسخ از کشور تایوان دریافت گردید، بر اساس پاسخ ارسالی از سوی Prof. Shau Chi در دومین دور از آزمایش PCR بر روی یکی از نمونه های مغز ارسالی از کفال ماهیان، RNA ویروس VNN یافت شده است ولی به دلیل شرایط نامناسب حمل نمونه ها، نوار حاصله بر روی ژل آگاروز بسیار ضعیف بوده و امکان تهیه عکس از آن میسر نبوده است.

همچنین ایشان اسلایدهای پاتولوژی را نیز بررسی نموده ولی به دلیل کیفیت نامناسب مقاطع آسیب شناسی، نامبرده اطمینان کامل از علت بروز آثار و اکوتولاسیون در مقاطع نداشت.

در جمع بندی ایشان اعلام نظر نمودند که بر اساس آزمایشات انجام شده، ماهیان کفال به ویروس VNN آلوده شده اند ولی با اطمینان قادر به بیان این موضوع نبودند که این ویروس عامل اصلی این ابتلای سراسری باشد و در پایان خواستار ارسال نمونه های جدید در شرایط انجماد و در مجاورت یخ خشک شدند تا مجدداً مورد آزمایشات PCR قرار گیرد.

در تاریخ ۸۲/۱۲/۲۹ از سوی آقای Prof. Nakai از آزمایشگاه فرانس کشور ژاپن اولین گزارش مقدماتی دریافت گردید. ایشان در این گزارش خود اعلام نمودند که در کمال تعجب تمام نمونه های مغز ارسالی در آزمایش RT-PCR نسبت به Piscine nodavirus عامل ایجاد بیماری VNN مثبت بوده اند. مقرر شد ایشان در آینده ای نزدیک گزارشی کامل از نتایج آزمایشات انجام شده را ارائه نمایند.

در فاصله مزبور و در ایام تعطیلات نوروزی و به دلیل اهمیت موضوع از طریق E.mail با ایشان در تماس بوده و از طریق نامبرده و آقای Prof. Shau Chi اطلاعات جامع و ارزشمندی در خصوص راههای کنترل و پیشگیری، درمان احتمالی، احتمال انتقال این بیماری به سایر گونه های آبی در دریای خزر همچون ماهی سفید و ماهیان خاویاری، خطر انتقال بیماری از طریق مصرف ماهیان مبتلا به انسان و احتمال بیماری مشترک بودن آن، احتمال سرایت بیماری به ماهیان پرورشی آبهای شیرین و ماهیان پرورش یافته در قفس<sup>۱</sup> دریای خزر، سرنوشت نهایی ماهیان مبتلا و درمان احتمالی آنها، علت ایجاد بیماری و راه اصلی ورود ویروس به دریای خزر دریافت و مورد مباحثه قرار گرفت که جهت آگاهی بیشتر تصویر کلیه مکاتبات ضمیمه می باشد.

مجموع اطلاعات حاصله حاکی از آن است که بحران جدیدی در انتظار دریای خزر و صنعت آبی پروری کشور می باشد و با توجه به طبیعت ویروس و خطر انتشار سریع آن در دریای خزر و ذخائر ارزشمند آبریان که می تواند بر اقتصاد منطقه آثار نگران کننده ای داشته باشد، این موضوع و پیگیری های بعدی آن می تواند از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد.

<sup>1</sup> -Cage culture

لازم به ذکر است که آقای Prof.Nakai در آخرین E.mail ارسالی ضمن درخواست نمونه جدید بیشتر جهت انجام آزمایشات تکمیلی با ارسال پروتکل ویژه ای خواستار انجام آزمایشات بیماریزایی<sup>1</sup> و انتقال تجربی بیماری بر روی ماهیان به ظاهر سالم شده که با توجه به هماهنگی های بعمل آمده با همکاران پژوهشکده اکولوژی دریای خزرپس از تهیه ماهیان کفال سالم ، مراحل مختلف این آزمایش نیز در آینده نزدیک انجام و پیگیری خواهد شد..

لازم به ذکر است که این بیماری ( VNN ) تاکنون بر روی ۳۰ گونه از ماهیان مختلف در کلیه نقاط جهان به جز قاره افریقا مشاهده شده است و با توجه به دامنه وسیع میزبانان که در سراسر جهان بسیاری از گونه های ماهیان دریایی را مبتلا کرده و در بسیاری از موارد منجر به مرگ و میر بچه ماهیان و ماهیان جوان شده که بالطبع منجر به کاهش وسیع ذخایر موجود خواهد شد ، پیش بینی بر آن است که در سال جاری و فصل آینده صید با کاهش قابل توجهی از کفال ماهیان در دریای خزر روبرو بوده و مشکلات بیشتری عاید صیادان منطقه شود . درضمن طبق اظهارنظر مدیر کل محترم شیلات استان گیلان میزان صید ماهیان استخوانی در استان گیلان در فصل صید اخیر در مقایسه با مدت مشابه در سال گذشته به میزان ۲۴٪ کاهش داشته است .

لذا در نهایت ، توصیه بر آن است که در اولین گام، با طراحی و تصویب یک پروژه تحقیقاتی ویژه و تامین اعتبارات مورد نیاز در اسرع وقت مطالعات تکمیلی آغاز گردد تا بتوان با تشخیص سریع و تعیین میزبانان حساس در دریای خزر اقدامات بعدی در خصوص تدوین راههای کنترل و پیشگیری از انتشار بیماری صورت پذیرد .  
در خاتمه اطلاعات تکمیلی در مورد این بیماری به پیوست ایفاد می گردد .

**دکتر سید جلیل ذریه زهرا**

**مدیر گروه بیماریهای ماهیان آب شیرین**

**بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان**

**موسسه تحقیقات شیلات ایران**

---

<sup>1</sup> - Pathogenicity



## بسمه تعالی

بیماری نکروز عصبی ویروسی Viral nervous necrosis این بیماری به عنوان یک بیماری ویروسی خطرناک بسیاری از بچه ماهیان ، ماهیان جوان و در پاره ای از موارد ماهیان دریایی بالغ را مبتلا نموده و تقریباً در سراسر جهان به استثنای افریقا رخ می دهد. در حال حاضر این بیماری از سی گونه ماهیان مختلف آبهای جهان گزارش شده که بیشترین تاکید بر روی گونه های ماهیان ذیل بوده است :

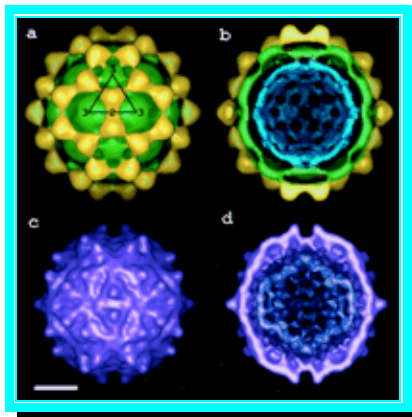
1- sea bass 2-Groupers 3-Jack 4-Puffer 5-Flatfish



نمایی از تلفات بیماری (VNN) در بچه ماهیان Sea bass

## اتیولوژی و سبب شناسی بیماری :

ویروس عامل بیماری نکروز عصبی متعلق به جنس بتانوداویروس (Betanodavirus) و از خانواده نوداویریده (Nodaviridae) به عنوان یک عضو جدید این خانواده محسوب می شود. قطر این ویروس ۲۵-۲۰ نانومتر بوده فاقد پاکت بوده و دارای تقارن کروی تا چند وجهی می باشد (تصویر ذیل)



۲ پروتئین ساختاری موجود در capsid ویروس از نوع گلیکو پروتئین می باشد و دارای وزن های مولکولی ۴۱ و ۴۳ کیلودالتون می باشند. ژنوم بتانودا ویروس همانند جنس آلفانودا ویروس (Alphanodavirus) (از جمله نودا ویروس های مربوط به حشرات) دارای دو مولکول RNA تک رشته ای است که وزن این دو مولکول RNA؛  $۰/۵ \times ۱۰^۳$  و  $۱/۰۲ \times ۱۰^۳$  کیلو دالتون می باشد.

نودا ویروس های ماهی در چهار ژنوتیپ ذیل طبقه بندی می شوند:

- 1- TPNNV: Tigre Puffer nervous necrosis virus
- 2- SJNNV: Striped Jack nervous necrosis Virus
- 3- BFNNV: Barfin flounder nervous necrosis Virus
- 4- RGNNV: Red – Spotted grouper nervous necrosis Virus

بافت عصبی به عنوان بافت هدف در این بیماری تلقی می شود و انتشار ویروس در بافت های دیگر بسته به گونه و سن ماهی متفاوت است

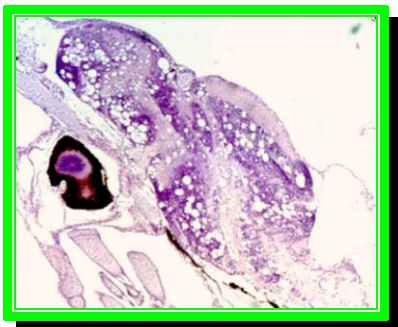


#### نمایی از پرخونی بافت مغز ماهی در بیماری (VNN) در بچه ماهیان Sea bass

این ویروس به  $pH = ۳$  (بسیار اسیدی) و  $pH = ۱۰-۱۲$  (بسیار قلیائی) بسیار حساس بوده و تیترو ویروس در این حالت به میزان  $۱۰^۴$  کاهش می یابد. در یک تیمار یک ساعته و در دمای  $۶۰^{\circ}C$  قابلیت بیماریزایی ویروس را می توان متوقف کرد. ویروس عامل نکروز عصبی در دمای  $۲۴-۳۲^{\circ}C$  منجر به ظهور ضایعات CPE بر روی تیره سلولی GF-1 می شود.

#### علائم کلینیکی و یافته های کالبد گشایی:

علائم اصلی بیماری با حالات متنوعی از اختلالات عصبی مشخص می گردد. مواردی همچون رفتارهای شنای نامتعارف (مارپیچی، چرخشی یا خوابیده بر آب با شکمی متورم) و بروز حالات و اکوئولاسیون (حفره حفره) در بافت عصبی مرکزی از موارد شاخص این بیماری است. معمولاً حالات و اکوئوله شدن در لایه های هسته دار بافت شبکیه چشم نیز وجود دارد. بطور معمول در ماهیان جوان ضایعات با شدت بیشتری به چشم می خورد. در ماهیان مسن تر ضایعات گسترده نبوده و در این سنین ضایعات نسبت به شبکیه تمایل بیشتری دارند. حضور گنجیدگی های داخل سیتوپلاسمی از سلولهای بافت مغز در برخی گونه ها، گزارش شده است ولی در اغلب گونه ها نکروز بافت عصبی عارضه ای معمول بوده و به کرات مشاهده شده است.



حالات و اکوئوله شدن در بافت عصبی مغز و بافت شبکیه چشم ماهی مبتلا به بیماری (VNN)



نمایی از آثار کالبد گشایی ماهی مبتلا و تورم کیسه شنا در بیماری (VNN) در ماهیان جوان Sea bass

در روند معمول بیماری، با شروع اولین علائم بالینی، مرگ و میر قابل توجهی در ماهیان رخ می دهد. با وجود آنکه بیماری در ماهیان جوان در برخی گونه ها بندرت اتفاق می افتد ولی مرگ و میر در سایر گونه ها اغلب در سنین پایین و ماهیان جوان رخ می دهد که

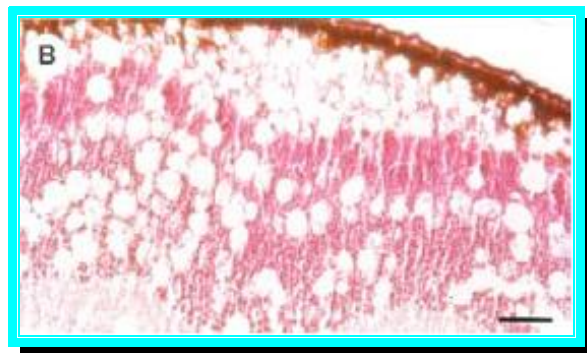
معمولاً به حد ۱۰۰٪ نمی رسد. این موضوع بیانگر وابسته به سن بودن و حساسیت ماهیان جوان به بیماری است. مرگ و میر قابل توجهی از ماهیان گونه Sea bass اروپایی و هامور (Grouper) در سنین بازاری گزارش شده است ولی در این گونه ها نیز مرگ و میر بیشتر در ماهیان جوان مشاهده شده است. انتقال عمودی عامل مسبب بیماری در گونه *P. dentex* به اثبات رسیده است و این حقیقت با رخداد زودرس چهره بالینی بیماری در ماهیان جوان مشخص شده است. این نتایج منجر به کنترل بیماری در بچه ماهیان جنس Striped Jack به نحو موفقیت آمیزی شده است که این عمل به کمک آزمون تشخیصی RT – PCR و به منظور تشخیص مولدین حامل ویروس و نیز ضد عفونی تخمهای بارور به وسیله گاز ازن صورت گرفته است.

همچنین بر خلاف انتظار، آلودگی مایعات تخمدانی نیز در گونه *D. Labrax* مشاهده است، این در حالی است که بطور معمول بیماری در این گونه معمولاً سی روز پس از بارور نمودن تخمها مشاهده می شود.

در خصوص راه انتقال و معرفی ویروس به محیط به غیر از انتقال از طریق سلول های جنسی و همزیستی ماهیان با هم تاکنون راه دیگری به اثبات نرسیده است ولی احتمالاتی همچون آبهای جاری، ماهیان جوانی که در یک مکان نگهداری می شوند، ظروف حمل ماهیان و کشتی ها نیز در انتقال بیماری مطرح می باشند. این موضوع به اثبات رسیده است که اینگونه ویروس های کوچک نسبت به شرایط محیطی کاملاً مقاوم بوده لذا می توانند به سهولت توسط فعالیت های تجاری در جهان منتشر گردند..

### روند تشخیص بیماری:

تشخیص اولیه بیماری VNN بر اساس ظهور ضایعات و اکوئولی در بافت مغز، نخاع و شبکیه چشم ماهیان مبتلاست که توسط میکروسکوپ نوری قابل تشخیص است. اگر چه در ماهیان منفردی که ضایعات و اکوئوله کمی را در بافت های عصبی خود نشان می دهند، تشخیص امر دشواری است.



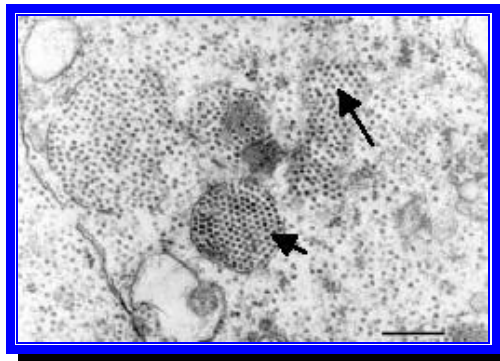
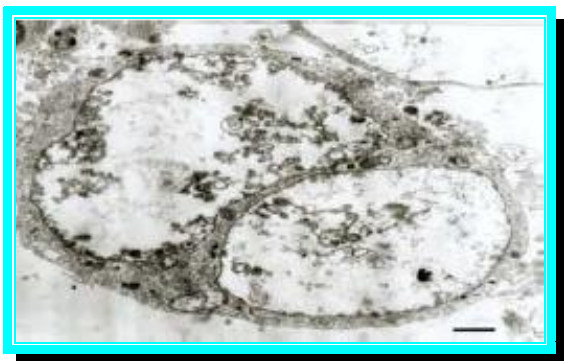
حالات واکوئوله شدن در بافت عصبی مغز (Br) و بافت شبکیه چشم (Re) ماهی مبتلا به بیماری (VNN)



ذرات ویروسی در بافت های مغز و شبکه ماهیان مبتلا هم در رنگ آمیزی مثبت و هم منفی قابل مشاهده است . در رنگ آمیزی مثبت ، ویروس با سلول های واکوئوله شده مرتبط بوده و با گنجیدگی هایی همراه است .

ذرات ویروسی متنوعی از حد ۲۲ تا ۳۴ نانومتر در داخل سیتوپلاسم سلولهای مبتلا در این بیماری گزارش شده است .

گاهی نیز این ذرات بصورت یک ویرون منفرد در هم متراکم شده و داخل و یا خارج سلول مشاهده می شود .



### نمایی از آثار ذرات ویروسی در بافت های مبتلا در بیماری (VNN)

تمامی بتانودا ویروس ها در بیماری VNN توسط آزمایشات آنتی بادی درخشان غیر مستقیم

Indirect fluorescent antibody test (IFAT) یا ( IFAT ) و آزمایش Immunohistochemistry قابل شناسایی می باشند که این

آزمایش توسط آنتی بادی Rabbit anti- SJNNV Serum که در خرگوش تهیه شده صورت می پذیرد . همچنین اغلب موارد

توسط آزمایش RT – PCR قابل تشخیص می باشند که این کار بر اساس پرایمر ( Primer ) منفردی که بر اساس ناحیه T4 ژن

پروتئین پوشش ویروس SJNNV با ۴۲۷ باز طراحی شده صورت می پذیرد . ( این پرایمر جهت شناسایی انواع ژنوتیپ های متنوع نودا

ویروس های عامل VNN ، بجز یک مورد استثناء ، کارآیی دارد ) با وجود آنکه سایر روش های سرولوژیک همچون ( ELISA )

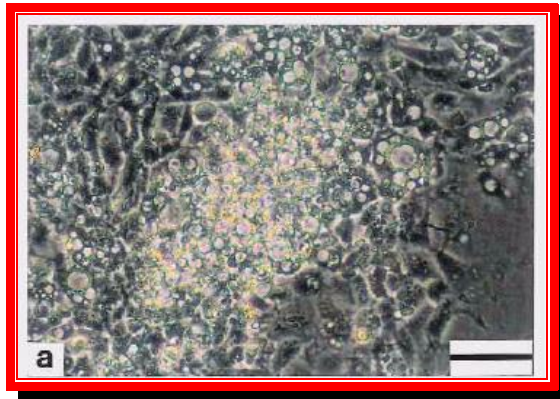
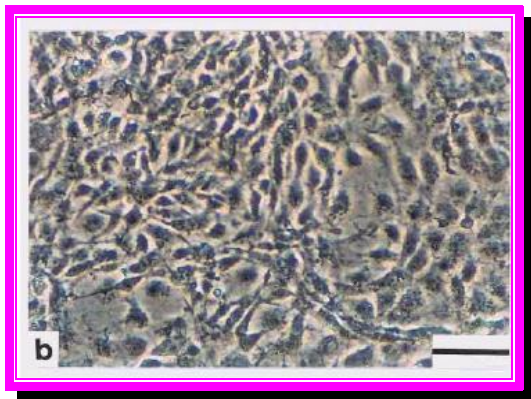
و (NT) نیز برای شناسایی ویروس ها مطرح بوده و در دسترس می باشند، در مورد بتانودا ویروس ها به دلیل آنکه اطلاعات سرولوژیک

محدودی وجود دارد ، تنها برای برخی موارد در VNN مورد استفاده قرار می گیرد .

همچنین می توان بتانودا ویروس ها را در تیره سلولی SSN- 1 کشت داد که این تیره سلولی از ماهی بنام Striped snake head

مشتق شده است . نوعی تیره سلولی مشتق شده از SSN-1 که آن را E-11 می نامند برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی همه بتانودا

ویروس کاربرد فراوان دارد .



نمایی از آثار CPE در تیره سلولی 1-SSN (سمت راست) و مقایسه آن با نمونه طبیعی (سمت چپ) در

### بیماری VNN

به دلیل فقدان اطلاعات کافی در پاسخ های ایمنی و سرولوژیک ماهیان به عفونت های ویروسی، تعیین میزان تیتراژ آنتی بادی های ضد ویروس VNN در ماهیان مبتلا، تاکنون به عنوان یک روش معمول و متعارف جهت ارزیابی آلودگی ویروسی در جمعیت ماهیان مورد پذیرش قرار نگرفته است.

### مواد مناسب جهت نمونه برداری برای آزمایشات ویروسی شناسی:

- ماهیان فاقد علائم بالینی ( ماهیان بظاهر سالم):

کل بدن بچه ماهیان و ماهیان جوان و برای ماهیان بزرگتر استفاده از بافت مغز، نخاع و چشمها ضروری است. همچنین مایعات تخمدانی از مولدین ماده در فصل تخم‌ریزی نیز توصیه می شود.

- ماهیان مبتلا و دارای علائم بالینی:

کل بدن بچه ماهیان و ماهیان جوان و برای ماهیان بزرگتر برداشت مغز، نخاع و چشم ها الزامی است.

نمونه های فوق الذکر بر اساس شرایط استاندارد نمونه برداری ( Sampling ) انتخاب و بر اساس نوع آزمون در محیط های خاص نگهدارنده قرار گرفته و در شرایط حمل استاندارد جهت انجام آزمایشات مربوطه به آزمایشگاه تخصصی مورد نظر ارسال خواهد شد.

### کنترل و پیشگیری:

در این بیماری هیچ راه کنترل مشخصی برای کنترل عفونت در میان جمعیت ماهیان وحشی تاکنون گزارش نشده است. تنها راه ممکن کاهش میزان عیار ویروس در محیط با استفاده از خارج نمودن ماهیان مبتلا از محیط، استریل نمودن آنان با محلول کلر و سپس دفن آنان

و یا سوزاندن مبتلایان می باشد (توصیه های Prof. shau chi در مکاتبات اخیر)

( این امر با توجه به وقوع عارضه در اکوسیستم طبیعی دریای خزر بسیار پیچیده، هزینه بر و دارای مشکلات اجرایی فراوان بوده و نیاز به تمهیدات خاصی دارد که امکانات فعلی موسسه پاسخگوی این نیاز نمی باشد)

لیکن در خصوص محیط های پرورشی جهت کنترل بیماری (VNN) روش های عملی تری توصیه شده است. از جمله جهت پیشگیری از انتقال عمودی بیماری، استفاده از مولدین عاری از ویروس و ضد عفونی تخم ها توسط ازن و یا اشعه UV و جهت پیشگیری از انتقال افقی بیماری، ضد عفونی آب مصرفی مزارع توصیه می گردد.

در حال حاضر استفاده از واکسن های نو ترکیب (recombinant) حاصل از پروتئین پوشینه ویروس (capsid protein) در مراحل آزمایش اولیه بوده و بصورت تجاری در دسترس نمی باشد.

### درمان :

همچون سایر بیماری های ویروسی آبزیان، هیچگونه درمانی برای ماهیان مبتلا وجود ندارد.

### تشکر و قدردانی :

در انجام این بررسی همکاران عزیزی سهم بوده اند که شایسته است با ذکر نام و در نهایت قدر شناسی، مورد تقدیر و تشکر قرار گیرند، از آقای دکتر مهدی سلطانی که با همکاری صمیمانه و همیشگی خود انجام آزمایشات باکتریولوژی و مراحل آماده سازی نمونه ها را در آزمایشگاه بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تقبل فرمودند، از آقای دکتر عیسی شریف پور که در بازدید و نمونه برداری از منطقه و بررسی مقاطع آسیب شناسی با دقت و حوصله بسیار همراهی نمودند، از آقای دکتر مصطفی شریف روحانی به پاس حمایت و همدلی های ایشان، از آقای دکتر علی اصغر سعیدی و همکاران محترم در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که عملیات خونگیری و بررسیهای هماتولوژی و تست بیماریزایی را قبول زحمت فرمودند تقدیر و تشکر می گردد.

همچنین از کلیه همکاران مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی، مسئولین مرکز و بویژه همکاران بخش بهداشت و بیماری های آبزیان و بخش اکولوژی مرکز و نیز همکاران عزیز بخش مدیریت ذخایر موسسه که از ابتدای وقوع عارضه مجدانه، همراهی نموده و با ارسال اطلاعات مورد نیاز زینت بخش این مجموعه شدند و نیز دانشجوی ساعی خانم شمس که در تهیه منابع و تصاویر بیماری قبول زحمت نمودند و آقای هادی باقری کارشناس محترم آزمایشگاه بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به پاس زحمات ایشان در آماده سازی نمونه ها، به سهم خود تشکر و قدردانی می گردد.



همچنین از مشاوران برون مرزی این بررسی ، آقایان Prof.Nakai از مرکز رفانس بیماری VNN در کشور ژاپن و Prof. Shau chi از کشور تایوان که در انجام آزمایشات تشخیصی و ارسال اطلاعات مورد نیاز صمیمانه همکاری نمودند و نیز آقای Dr. Igor Shchelkunov رئیس بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات آبهای شیرین موسسه (VNIIPRH) کشور روسیه به پاس محبت های همیشگی ایشان ، تقدیر و تشکر می گردد..

از زحمات همکاران امور اداری موسسه نیز به خاطر ارسال نمونه ها و تایپ گزارش سپاسگزاری می گردد.

### منابع و مأخذ:

1. Chi، Shau. Chi، Lo C.F، Kou G.H، Chang P.S، Peng S.E. & Chen S.N.(1997). Mass mortalities associated with nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper، *Epinephelus fuscogutatus* and *E. akaara* (Temminck & Schlegal ) .*J.Fish Dis.*،**20**،185-193.
2. Fukuda Y، Nguyen H.D، Funuhashi M. & Nakai T. (1990) Mass mortality of cultured sevenband grouper، *Epinephelus septemfasciatus*، associated with viral nervous necrosis .*Fish Pathol.*، **31** ، 165-170 .
3. Iwamoto T، Mise K، Mori K، Arimoto M، Nakai T.& Okuno T (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for *striped jack nervous necrosis virus*، the type species of the *Betanodavirus* ،*J.Gen Virol.*، **82**، 2653-2662.
4. Mori K، Nakai T، Murogo K، Arimoto M، Mekuchi T،& Kanno T.(1991). A viral disease in hatchery –reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*، **26**، 209-210.
5. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2003)، Part 2، Section 2.1، Chapter 2.1.7، Office International Epizootic (O.I.E) .
6. Nakai T، Nguyen H.D، Nishizawa T، Muroga K، Arimoto M، & Ootsuki K. (1994). Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer .*Fish Pathol.*، **29**، 211-212.
7. Nishizawa T، Mori K، Nakai T، Furusava I، & Murogo K،(1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat.Org.* ، **18**، 103-107.

## ضمائم و پیوست ها

In the name of God

**Iranian Fisheries Research Institute**

Research Deputy

Aquatic Animal Health & Diseases Dept.

**Technical Report of**

**First occurrence of viral nervous necrosis (VNN)  
in Golden grey mullet of Caspian Sea in Iran**



By:

Dr.Seyed Jalil Zorriehzahra (D.V.M)

Scientific Board of  
Iranian Fisheries Research Institute

April 2004